



Sveučilište u Zagrebu  
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET  
Kemijski odsjek

TEA DOMIN

**KRISTALIZACIJA DERIVATA  
APOTRANSFERINA S MALIM KIRALNIM  
MOLEKULAMA**

**Diplomski rad**

predložen Kemijskom odsjeku

Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu

radi stjecanja zvanja

diplomiranog inženjera kemije

Zagreb, 2019. godina.

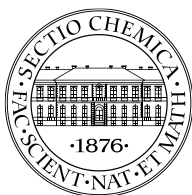
Ovaj diplomski rad izrađen je u Zavodu za opću i anorgansku kemiju Kemijskog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom prof. dr. sc. Dubravke Matković-Čalogović i neposrednim voditeljstvom doc. dr. sc. Ivice Đilovića

## **Zahvale**

Hvala svima na strpljenju.

## Sadržaj

<b>SAŽETAK .....</b>	<b>V</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>VI</b>
<b>§ 1. UVOD .....</b>	<b>7</b>
<b>§ 2. LITERATURNI PREGLED .....</b>	<b>8</b>
2.1. Proteini .....	8
2.2. Željezo .....	9
2.3. Transferin.....	9
2.4. Male kiralne molekule .....	12
2.5. Kristalizacija proteina .....	17
2.6. Metode kristalizacije .....	20
2.7. Kristali.....	21
2.8. Rentgenska strukturna analiza.....	23
<b>§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO.....</b>	<b>25</b>
3.1. Priprema otopine pufera.....	25
3.2. Priprema otopina liganda (malih kiralnih molekula) .....	25
3.3. Priprema otopine apotransferina .....	26
3.4. Postupak kristalizacije .....	28
<b>§ 4. REZULTATI I RASPRAVA.....</b>	<b>32</b>
<b>§ 5. ZAKLJUČAK.....</b>	<b>36</b>
<b>§ 6. POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA .....</b>	<b>38</b>
<b>§ 7. LITERATURNI IZVORI.....</b>	<b>39</b>
<b>§ 8. DODATAK .....</b>	<b>40</b>
<b>§ 9. ŽIVOTOPIS .....</b>	<b>XLIII</b>



Sveučilište u Zagrebu  
Prirodoslovno-matematički fakultet  
**Kemijski odsjek**

Diplomski rad

## SAŽETAK

Kristalizacija derivata apotransferina s malim kiralnim molekulama

Tea Domin

Transferin je protein krvne plazme koji se nalazi u skoro svim živim bićima i njegove su glavne funkcije transport i reguliranje količine željeza u krvi. Apotransferin je slobodan oblik proteina, onaj na koji nije vezano željezo. Koristi se u kapilarnoj elektroforezi za razdvajanje enantiomera nekih malih kiralnih molekula no još nije dovoljno istraženo gdje i kako se te molekule vežu na apotransferin. Rentgenskom strukturnom analizom mogu se dobiti takve informacije.

U ovom radu opisan je postupak kristalizacije apotransferina s malim kiralnim molekulama metodom difuzije para viseće kapi. Cilj je rada bio dobiti što kvalitetniji kristal različitih kompleksa apotransferin – mala kiralna molekula, a koji bi bili podvrgnuti difrakciji rentgenskih zraka. Na taj bi način dobili uvid u strukturu te mjesto i moguće načine vezanja malih molekula na apotransferin. Uspješno je iz kristalizacijskih otopina kojima su dodane male molekule nastalo nekoliko kristala no nažalost nisu bili zadovoljavajuće kvalitete za strukturno istraživanje difrakcijom rentgenskih zraka.

(43 stranica, 21 slika, 7 tablica, 20 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski jezik)

Rad je pohranjen u Središnjoj kemijskoj knjižnici Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Horvatovac 102a, Zagreb i Repozitoriju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

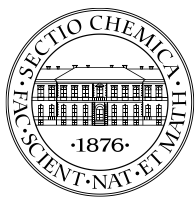
Ključne riječi: apotransferin, kiralna molekula, kristalizacija, makromolekula, željezo

Mentor: prof. dr. sc. Dubravka Matković-Čalogović, redoviti profesor u trajnom zvanju  
Neposredni voditelj: doc. dr. sc. Ivica Đilović, docent

Ocjenitelji:

1. dr. sc. Dubravka Matković-Čalogović, red. prof.
2. dr. sc. Vesna Petrović Peroković, izv. prof.
3. dr. sc. Sanda Rončević, izv. prof.

Datum diplomskog ispita: 30. rujna 2019. godine



University of Zagreb  
Faculty of Science  
**Department of Chemistry**

Diploma Thesis

## ABSTRACT

Crystallization of apotransferrin derivatives with small chiral molecules

Tea Domin

Transferrin is a blood plasma protein found in almost all living organisms and its main functions are to transport and regulate the amount of iron in the blood. Apotransferrin is the free form of the protein, without bound iron. It has been used in capillary electrophoresis to separate enantiomers of some small chiral molecules. There are no data yet about the sites and ways these molecules bind to apotransferrin. X-ray diffraction of such molecules can give us such information.

In this thesis the crystallization process of apotransferrin with small chiral molecules by the hanging drop vapour diffusion method is described. The aim of this work was to obtain crystals of different complexes of apotransferrin with small chiral molecules. Crystals would be subjected to X-ray diffraction which would give insight into the structure and possible ways of binding of small molecules to apotransferrin. Several crystals were successfully obtained from crystallization solutions with added small molecules. Unfortunately the resulting crystals were not of satisfactory quality for the X-ray diffraction structure analysis.

(43 pages, 21 figures, 7 tables, 20 references, original in Croatian)

Thesis is deposited in the Central Chemical Library, Faculty of Science, University of Zagreb, Horvatovac 102a, Zagreb, Croatia and in the Repository of the Faculty of Science, University of Zagreb.

Keywords: apotransferrin, chiral molecule, crystallization, iron, macromolecule

Mentor: dr. sc. Dubravka Matković-Čalogović,  
Assistant mentor: dr. sc. Ivica Đilović, assistant prof.

Reviewers:

1. dr. sc. Dubravka Matković-Čalogović, prof.
2. dr. sc. Vesna Petrović Peroković, associate prof.
3. dr. sc. Sanda Rončević, associate prof.

Date of exam: September 30th 2019

## § 1. UVOD

Transferin je protein koji nalazimo u krvnoj plazmi većine živih organizama. Glavna uloga transferina prijenos je iona željeza u  $\text{Fe}^{3+}$  obliku do jetre, slezene i koštane srži. Rentgenska strukturna analiza pokazala je da transferin odnosno apotransferin (protein bez vezanog  $\text{Fe}^{3+}$  iona) prolazi veliku konformacijsku promjenu u strukturi, iz otvorene forme prelazi u zatvorenu formu.<sup>1</sup> Slijed reakcija koje vode do te promjene nije poznat kao niti način vezanja nekih drugih atoma ili molekula.

Interakcija između proteina i supstrata može se prikazati molekulskim modeliranjem, ali samo ako je poznata trodimenzionalna struktura proteina. Struktura transferina relativno je dobro opisana, a apotransferin se pokazao kao vrlo koristan protein u kapilarnoj elektroforezi za razdvajanje enantiomera nekih kiralnih molekula. Informacije o načinu vezanja odnosno interakciji malih kiralnih molekula s proteinom od velike je važnosti za farmaceutsku industriju jer oko 40 % lijekova sadrži barem jedan kiralni centar, a barem jedan stereoizomer ima željeno farmaceutsko djelovanje.<sup>2</sup>

Cilj diplomskog rada priprema je kristala apotransferina (apoTf) iz ljudskog seruma s malim kiralnim molekulama: L-dopom, D-dopom, prometazinom, labetalolom, propranololom te propranolol hidrokloridom. Svrha ovog rada je pronaći pogodne uvjete za kristalizaciju apotransferina s malim kiralnim molekulama metodom difuzije para viseće kapi te dobiti kristale dobre kvalitete koji se mogu podvrgnuti rentgenskoj strukturnoj analizi.

## § 2. LITERATURNI PREGLED

### 2.1. Proteini

Proteini nastaju međusobnim povezivanjem  $\alpha$ -aminokiselina peptidnom vezom pri čemu nastaju dugi lanci molekulske mase veće od 10.000 D i više. Sastavni su dio svih živih stanica i o njima ovise sve osnovne životne funkcije jer sudjeluju u svim biološkim procesima. Svaki protein ima točno određeni sastav odnosno slijed aminokiselina.

Prema redoslijedu aminokiselina u lancu te prema prostornom rasporedu tih lanaca razlikujemo četiri razine strukture proteina:

1. primarna struktura je redoslijed aminokiselina međusobno povezanih peptidnom vezom. Svaki polipeptidni lanac ima dva kraja: N-kraj (amino kraj) i C-kraj (karboksilni kraj). Redoslijed aminokiselina u proteinu vrlo je bitan jer on određuje trodimenzionalnu strukturu proteina i ključan je za njegovu funkciju.
2. sekundarna struktura je periodička uređena struktura koju tvore lanci polipeptida. Prema Paulingu i Coreyu postoje dvije vrste takvih struktura, i to  $\alpha$ -zavojnica i  $\beta$ -nabrana ploča, koje nastaju zbog stvaranja vodikovih veza između bočnih ograna aminokiselina.
3. tercijarna struktura je trodimenzionalna struktura, a ovisi o vezama koje stvaraju udaljene aminokiseline u polipeptidnom lancu te načinu slaganja elementa sekundarne strukture. Kada govorimo o tercijarnoj strukturi onda mislimo na razmještaj  $\alpha$ -zavojnica i  $\beta$ -nabranih ploča te interakcija koje se javljaju među njima.
4. kvaterna struktura opisuje proteine koji se sastoje od više polipeptidnih lanaca odnosno podjedinica. Kvaterna struktura je u stvari prostorni raspored podjedinica. Ukoliko su podjedinice jednake govorimo o homogenoj kvaternoj strukturi odnosno ako se radi o različitim podjedinicama o heterogenoj kvaternoj strukturi.

Ovisno o kemijskim odnosno fizikalnim svojstvima proteine dijelimo u nekoliko skupina. Prema topljivosti proteine možemo podijeliti u dvije skupine: one netopljive u vodi



tzv. skleroproteine te one topljive u vodi odnosno sferoproteine (ili globularni proteini). Možemo ih podijeliti i prema složenosti pa tako imamo jednostavne proteine koji su građeni samo od aminokiselina i proteinske komplekse koji su građeni od aminokiselina i nepolipeptidne jedinice odnosno prostetičke skupine. Proteinske komplekse dalje dijelimo na: glikoproteine (prostetička skupna su šećeri), fosfoproteine (vezana je fosfatna skupina), nukleoproteine (na protein su vezani nukleotidi), lipoproteine (vezani su lipidi), kromoproteine (na protein je vezana obojena skupina) te metaloproteine (na protein su vezani ioni metala među kojima su najzastupljeniji: ion željeza, nikla, bakra i cinka).<sup>3,4</sup>

## 2.2. Željezo

Željezo je 26. element periodnog sustava elemenata, molekulske mase 55,847 i spada u grupu prijelaznih metala. To je element koji je vrlo rasprostranjen u prirodi (udio željeza u Zemljinoj kori iznosi oko 5 % njene ukupne mase, a nalazimo ga u obliku oksidnih, karbonatnih i silikatnih ruda). On najčešće stvara spojeve u oksidacijskom stanju +2 ( $d^6$ ) i +3 ( $d^5$ ) no postoje i spojevi u kojima željezo ima stupanj oksidacije 0 i +6.<sup>5</sup>

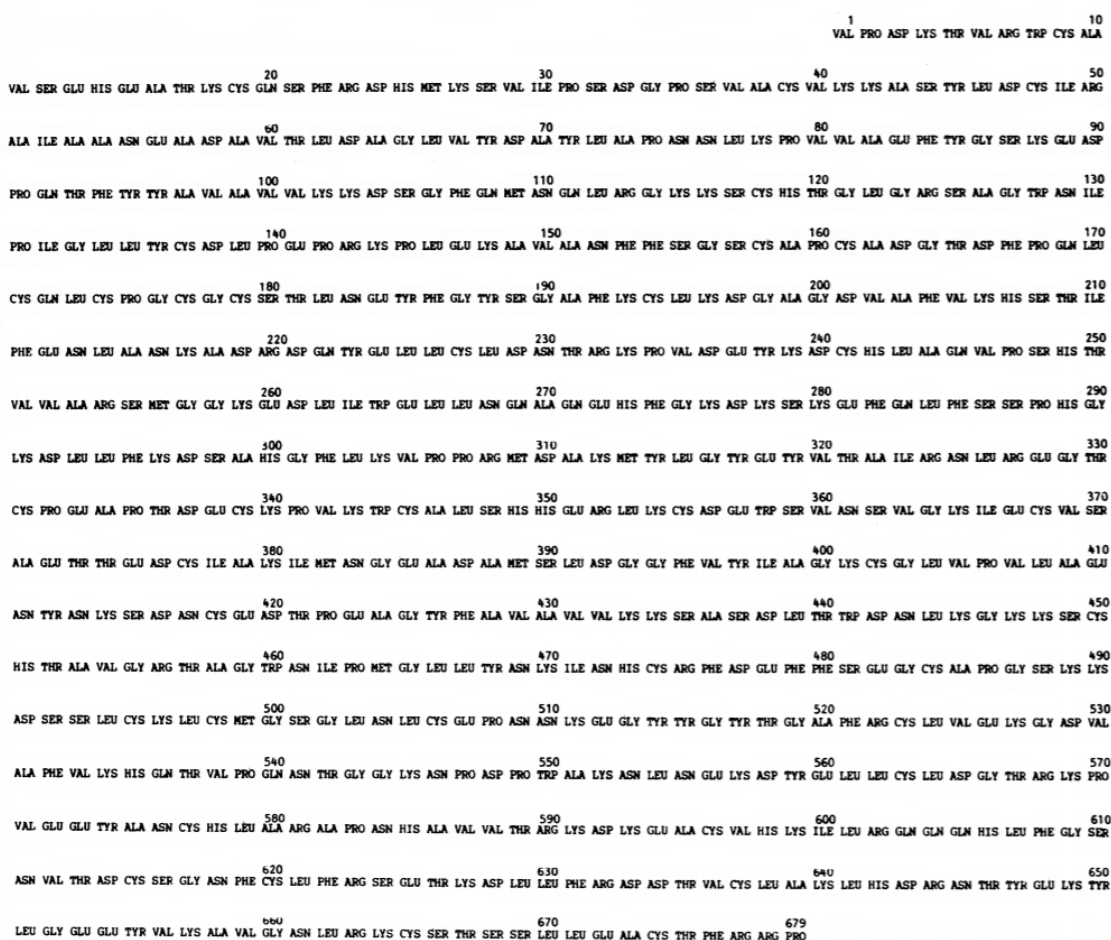
Zbog jednostavne i lake promjene oksidacijskog stanja sudjeluje u velikom broju bioloških reakcija.<sup>6</sup> U organizmu ga nalazimo u obliku različitih metaloproteina: hemoglobina i mioglobina koji prenose kisik, feritina koji skladišti željezo, transferina koji prenosi željezo krvnom plazmom te još nekih drugih proteina.

## 2.3. Transferin

Postoji nekoliko tipova transferina: u krvnoj plazmi nalazimo serumski transferin (sTf), u bjelanjku ovotransferin (oTf), a u mlijeku nalazimo laktotransferin (lTf). Svi oblici imaju zajedničku ulogu, a to je transport željeza.

Serumski transferin protein je molekulske mase oko 80 kD, sadrži polipeptidni lanac od 679 aminokiselina, slika 1, koje tvore  $\alpha$ -zavojnice i  $\beta$ -nabrane ploče, slika 2. Prostorni raspored

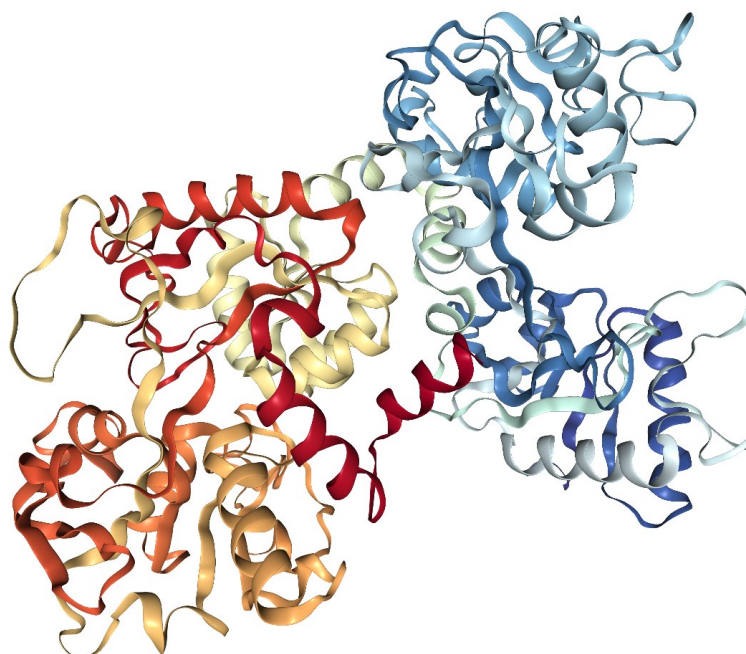
lanca takav je da tvori dvije homologne podjedinice: N i C podjedinicu (engl. *N & C lobe*), a svaka od te dvije podjedinice sadrži dvije domene ( $C_1$  i  $N_1$  i  $C_2$  i  $N_2$ ). Na svakoj podjedinici nalazi se po jedno vezno mjesto za željezo. Željezo se nakon apsorpcije iz tankog crijeva u krvnoj plazmi veže lako i reverzibilno na apotransferin pri čemu nastaje transferin.



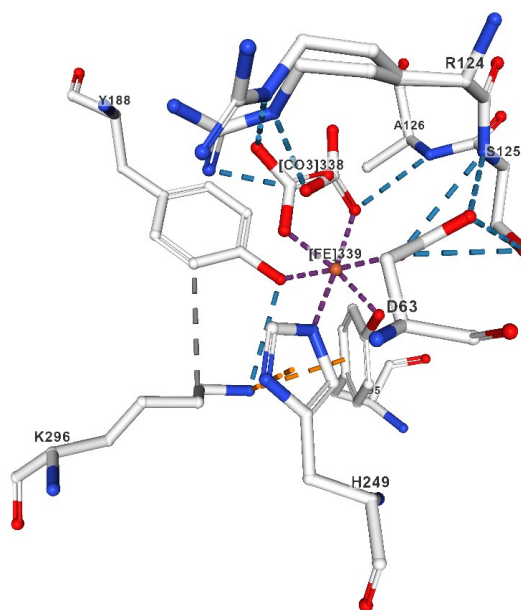
Slika 1. Aminokiselinski slijed transferina<sup>7</sup>

Domene unutar podjedinica postavljene su tako da ograđuju aktivno mjesto na kojem se nalazi vezno mjesto željeza. Sa stražnje strane svakog aktivnog mjesta nalaze se dvije antiparalelne  $\beta$ -ploče koje povezuju dvije domene i ujedno omogućuju približavanje i odmicanje domena odnosno aktivno mjesto se otvara ili zatvara. Okolina oko aktivnog mjesta je hidrofilna, sadrži puno polarnih ostataka aminokiselina te oko desetak molekula vode, čime su stvoreni povoljni uvjeti za vezanje iona željeza.

$\text{Fe}^{3+}$  ion preferira koordinacijski broj 6. U transferinu se na četirima mjestima vežu aminokiseline s transferinskog polipeptidnog lanca i to asparagin, tirozin i histidin, a na peto i šesto koordinatno mjesto veže se karbonatni ion ( $\text{CO}_3^{2-}$ ) te je time upotpunjena oktaedarska koordinacija željeza, slika 3. U otvorenoj konformaciji apotransferina proteinski ligandi u direktnom su kontaktu s okolinom, dok prilikom vezanja željeza dolazi do zatvaranja konformacije te se željezo nalazi u unutrašnjosti odnosno ispod površine transferina. Karbonatni ion kao sinergistički anion ne sudjeluje samo u koordiniranju željeza već i u neutralizaciji pozitivnog naboja unutar veznog mjesta, čime vezno mjesto postaje pristupačnije za vezanje željeza.



Slika 2. Vrpčasti prikaz strukture transferina, crveno obojena vrpca predstavlja N podjedinicu, a plavo obojena C podjedinicu, PDB broj 3QYT<sup>8</sup>



Slika 3. Prikaz oktaedarske koordinacije oko  $\text{Fe}^{3+}$  iona u N-podjedinici serumskog transferina, PDB broj 1A8F<sup>9</sup>

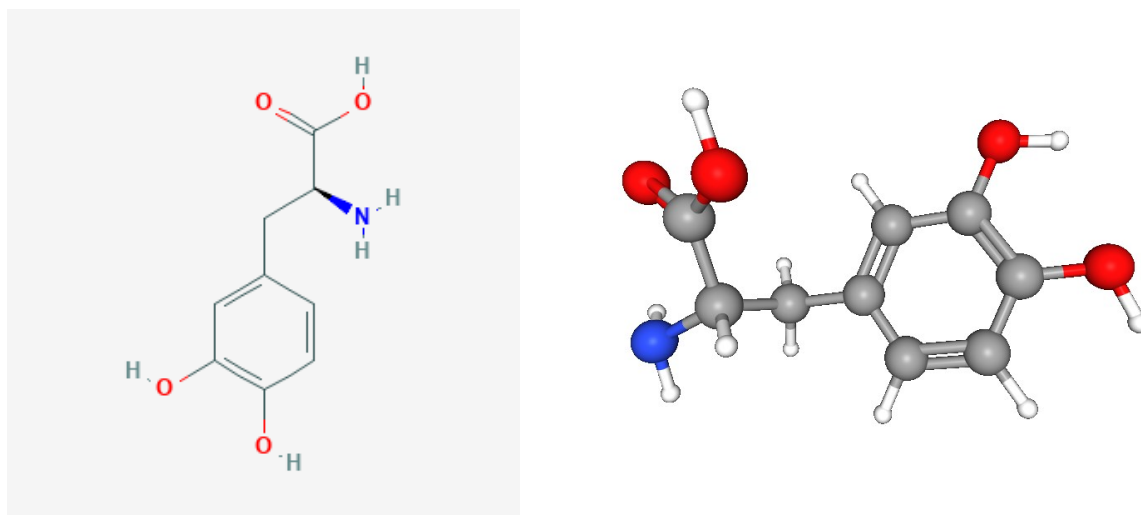
## 2.4. Male kiralne molekule

Kiralnost je geometrijsko svojstvo nekih molekula i kažemo da je neka molekula kiralna ako se ne može preklopiti sa svojom zrcalnom slikom. Kiralna molekula je svaka molekula koja se ne može preklopiti sa svojom zrcalnom slikom čak niti nakon operacije rotacije oko jednostruke veze ili translacije pa kažemo da je molekula kiralna u svim svojim konformacijama. Kako bi se odredilo je li neka molekula kiralna ili akiralna, potrebno je analizirati sve moguće konformere te molekule. Jedan od najjednostavnijih no ne i nužno jedini uvjet kiralnosti jest postojanje kiralnog centra, atoma na kojeg su vezane četiri različite grupe.

### 2.4.1. Levodopa

Levodopa ili L-dopa komercijalno je ime za 3-hidroksi-L-tirozin odnosno (2S)-2-amino-3-(3,4-dihidroksifenil) propansku kiselinu. Prikaz molekulске strukture modelom klinova te modelom kuglica i štapića prikazan je na slici 4. Molekulska formula mu je

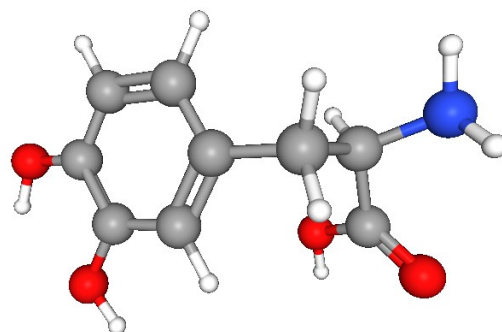
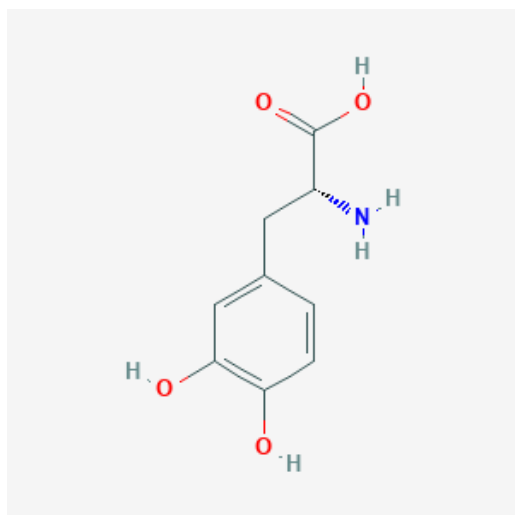
$C_9H_{11}NO_4$ . To je optički aktivan oblik dopamina, a nalazimo ga u obliku bezbojnih do svijetložuto obojenih kristala ili praškastih kristala bez mirisa i okusa. Prema kemijskom sastavu levodopa je aminokiselina koja nastaje biosintezom tirozina uz prisustvo tirozin hidroksilaze. Prekursor je dopamina, adrenalina i noradrenalina, a uz L-fenilalanin i L-tirozin, levodopa je prekursor melanina.



Slika 4. Prikaz molekule 3-hidroksi-L-tirozina (levodopa) te modelom kuglice i štapića (atomi ugljika sivo su obojani, kisika crveno, a dušika plavo)<sup>10</sup>

#### 2.4.2. D-dopa

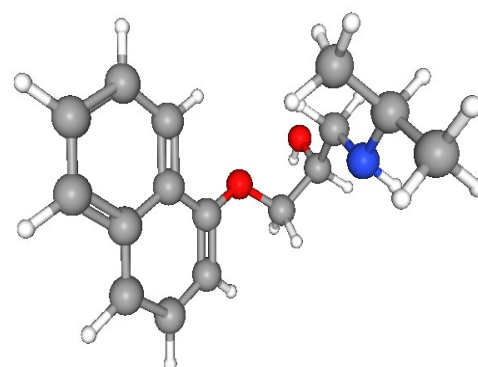
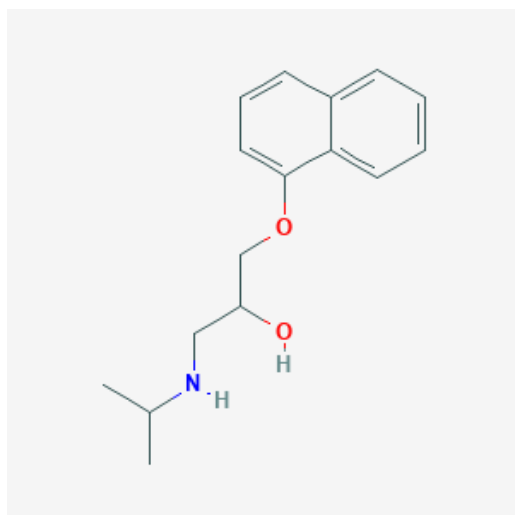
D-dopa ili dekstrodope poznata je i po imenu 3-hidroksi-D-tirozin. Slika 5 prikazuje molekulsku strukturu dekstrodope modelom klinova i modelom kuglica i štapića. Ima istu molekulsku formulu kao i levodopa,  $C_9H_{11}NO_4$ , budući je njen enantiomer (razlikuju se jedino po prostornom rasporedu atoma odnosno skupina vezanih na kiralni centar). U krutom je stanju u obliku bezbojnih do bijelih kristala bez okusa i mirisa. D-dopa biološki je neaktivna molekula.



Slika 5. Prikaz molekule 3-hidroksi-D-tirozina pomoću klinova te prikaz kuglica i štapić modelom (sivo su obojeni atomi ugljika, crveno kisika, a plavo je obojen atom dušika)<sup>11</sup>

#### 2.4.3. Propranolol

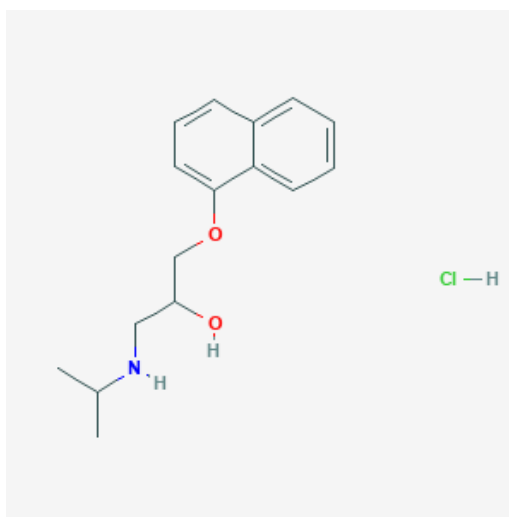
1-naftalen-1-iloksi-3-(propan-2-ilamino)propan-2-ol je krutina čiji je jedan od komercijalnih naziva propranolol, slika 6. Njegova molekulska formula je  $C_{16}H_{21}NO_2$ . Za otkriće propranolola J. W. Black nagrađen je Nobelovom nagradom za medicinu 1988. godine.



Slika 6. Prikaz molekulske strukture propranolola pomoću klinova te prikaz modelom kuglice i štapića (sivo obojeni ugljik, crveno kisik i plavo obojeni atom dušika)<sup>12</sup>

#### 2.4.4. Propranolol – HCl

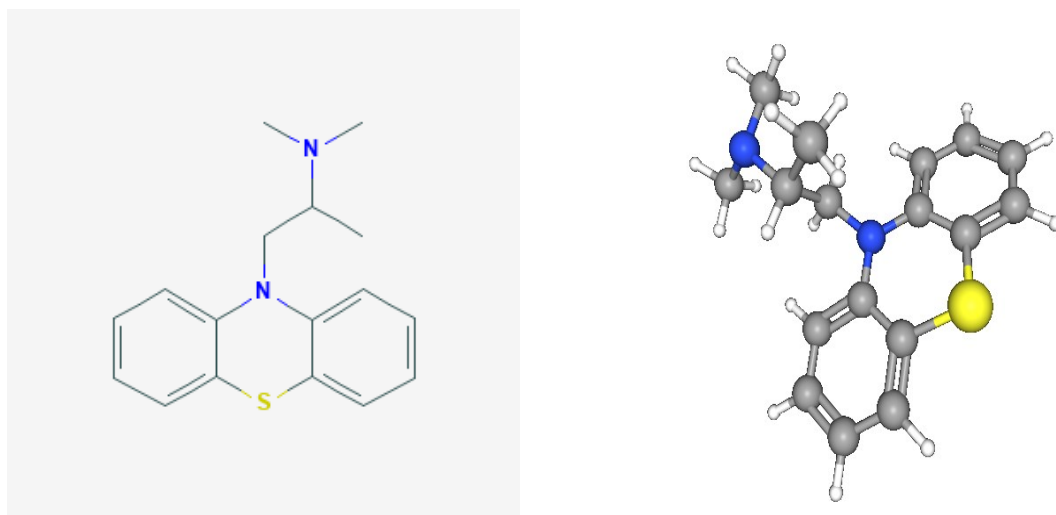
1-naftalen-1-iloksi-3-(propan-2-ilamino)propan-2-ol hidroklorid ili propranolol-HCl, kemijski je spoj molarne mase  $295,80 \text{ g mol}^{-1}$ . Kemijska formula spoja je  $\text{C}_{16}\text{H}_{22}\text{ClNO}_2$ . To je bijeli prah gorkog okusa i bez mirisa, a slika 7 prikazuje njegovu molekulsku strukturu.



Slika 7. Prikaz molekulske strukture 1-naftalen-1-iloksi-3-(propan-2-ilamino)propan-2-ol hidroklorida<sup>13</sup>

#### 2.4.5. Prometazin

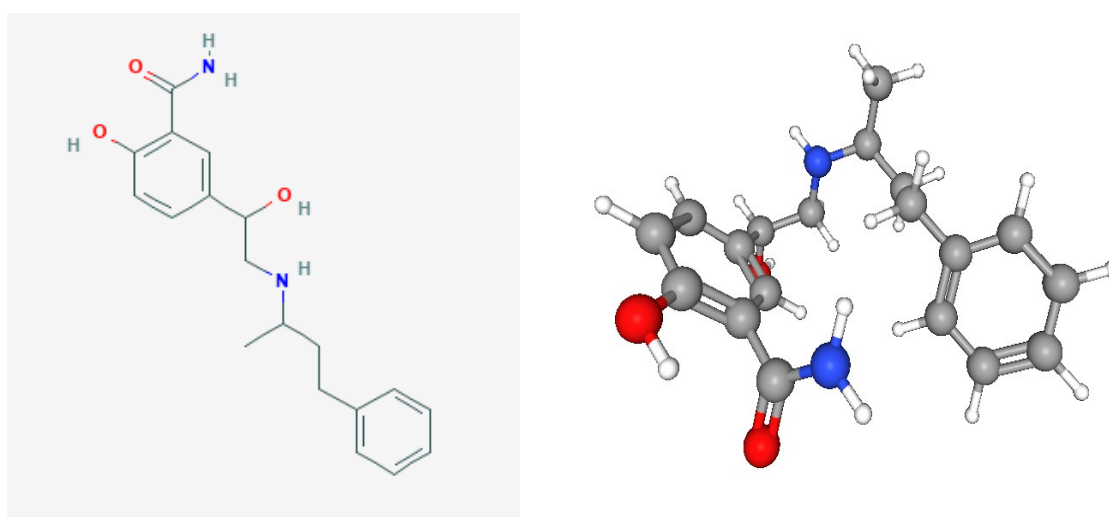
Prometazin ili *N,N*-dimetil-1-fenotiazin-10-ilpropan-2-amine kemijski je spoj molekulske formule  $\text{C}_{17}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{S}$  i molekulske mase  $284,4 \text{ g mol}^{-1}$ , slika 8. U obliku je krutine, točnije bijelih do blijedožutih kristala. Fotosenzitivan je, a u vlažnim uvjetima mijenja boju u plavu.



Slika 8. Prikaz molekule prometazina te prikaz modelom kuglice i štapića (sivo su obojani atomi ugljika, plavo obojeni atomi dušika, a žuto je obojen atom sumpora)<sup>14</sup>

#### 2.4.6. Labetalol

2-hidroksi-5-[1-hidroksi-2-(4-fenilbutan-2-ilamino)etil]benzamide ili labetalol kemijski je spoj molekulske mase  $328,4 \text{ g mol}^{-1}$ , slika 9. To je krutina osjetljiva na svjetlost i vlagu. Labetalol ima dva kiralna atoma odnosno 4 stereoizomera. (*S,S*) i (*R,S*) izomeri su neaktivni dok su (*S,R*) i (*R,R*) aktivni, tj. pokazuju optičku aktivnost.



Slika 9. Prikaz dvodimenzijske strukture labetalola te prikaz modelom kuglice i štapića (sivo obojani su atomi ugljika, plavo dušika, a crveno kisika)<sup>15</sup>



## 2.5. Kristalizacija proteina

Svaki je protein jedinstven pa se tako i proces kristalizacije proteina mora odvijati pod određenim, za njega specifičnim uvjetima. Na proces kristalizacije utječe veliki broj faktora, što kemijskog, što fizikalnog i/ili biokemijskog podrijetla. Faktori koji utječu na rast kristala proteina ne ovise međusobno jedni o drugima. Ponekada je teško predvidjeti koji su najpovoljniji uvjeti za kristalizaciju pojedinog kristala te se sam proces svodi na princip pokušaja i pogreške. Upravo tim pokušajima i pogreškama došlo se do zaključka da su glavni faktori koji utječu na rast kristala proteina: temperatura, pH otopine te čistoća, koncentracija i topljivost proteina. Pokazalo se da što je čistoća proteina veća to je i vjerojatnost da će se protein kristalizirati veća. U tablici 1 navedeni su još neki faktori koji utječu na proces kristalizacije proteina.

Tablica 1. Kemijski, fizikalni i biokemijski faktori koji utječu na kristalizaciju proteina

<i><b>Kemijski faktori</b></i>	<i><b>Fizikalni faktori</b></i>	<i><b>Biokemijski faktori</b></i>
Koncentracija proteina	Temperatura	Čistoća proteina
Koncentracija taloga	Tlak	Vrsta liganada
Vrsta taloga	Površina	Agregatno stanje
Ionska jakost	Vrijeme	Izoelektrična točka
Stupanj prezasićenja	Dielektrična svojstva	Kemijska modifikacija
pH	Viskoznost	Genetička modifikacija
Reduktivno-oksidativno okruženje	Brzina postizanja ravnoteže	Stabilnost proteina

### 2.5.1. Temperatura

Temperatura pri kojoj se najčešće kristaliziraju proteini je ili sobna temperatura ili temperatura od 4°C. Neki proteini slabije su topljivi pri nižim temperaturama. Također pri nižim se temperaturama sprečava rast bakterija koje ugrožavaju stabilnost i postojanost

proteina. Odabir pri kojoj temperaturi će se odvijati kristalizacija najviše ovisi o stabilnosti proteina pri određenoj temperaturi.

### 2.5.2. *pH*

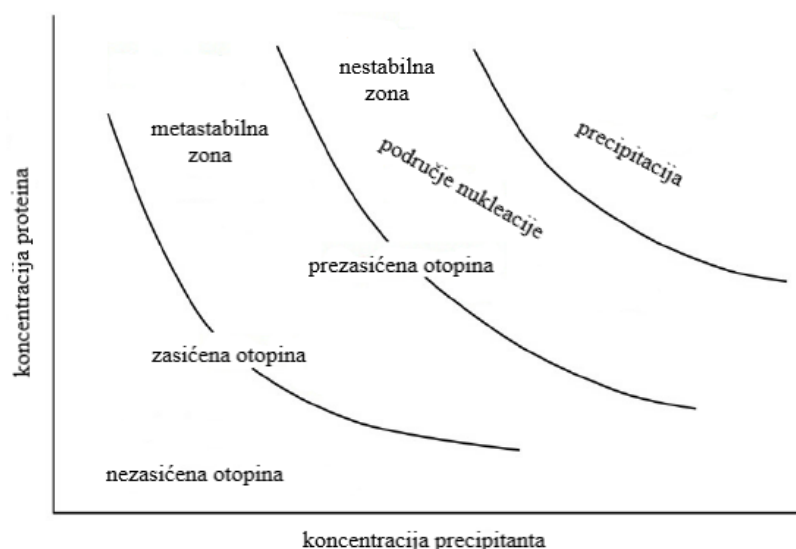
Kako se radi o kristalizaciji bioloških molekula, većina proteina kristalizira pri fiziološkom pH (pH oko 7). Ukoliko se radi o kristalizaciji proteina pri pH većem ili manjem od 7, potrebno je paziti da ne dođe do denaturacije proteina. Također oblik kristala često ovisi direktno o pH otopine te razlika između amornog taloga, mikrokristala i/ili monokristala može se pokazati u desetinki pH jedinice.

### 2.5.3. *Koncentracija proteina*

Koncentracija proteina još je jedan od bitnih faktora koji utječu na kristalizaciju. Ukoliko bi koncentracija bila prevelika u procesu kristalizacije može doći do stvaranja nakupina kristala i sraslaca, odnosno ukoliko bi koncentracija bila premala dolazi do usporavanja rasta kristala. Za dobivanje kristala dobre kvalitete, koje možemo podvrgnuti rentgenskoj strukturnoj analizi, potrebno je postići stupanj prezasićenja kod kojeg će lako doći do nukleacije odnosno rasta kristala.

### 2.5.4. *Topljivost proteina*

Kako bi istaložili protein, potrebno ga je prvo otopiti. Neki proteini dobro su topljivi u vodi dok drugi nisu. Otapala koja se uglavnom koriste su voda, polietilenglikol (kratica PEG) ili neko drugo organsko otapalo. Pri odabiru pogodnog otapala trebamo paziti da protein ne asocira odnosno da ne stvara agregate u takvoj otopini. Povećanje topljivosti proteina može se regulirati dodavanjem soli, a također ovisi i o temperaturi i pH vrijednosti.



Slika 10. Shematski prikaz krivulje topljivosti proteina kao funkcije ovisnosti koncentracije precipitanta i koncentracije proteina

Proces kristalizacije sastoji se od nekoliko koraka: prvi je korak određivanje čistoće proteina. Ukoliko protein nije zadovoljavajuće čistoće prije kristalizacije, potrebno ga je pročititi. Proteini se pročišćavaju na temelju svojih fizikalno-kemijskih svojstava, veličini molekule i električnom naboju, dok se tehnikama afinitetne kromatografije proteini odjeljuju i pročišćavaju na temelju sposobnosti proteina da na sebe veže određene male molekule.

Drugi je korak otapanje proteina u pogodnom otapalu iz kojeg se može istaložiti dodatkom bilo neke soli ili organskog spoja. Otapala koja se najčešće koriste su puferske vodene otopine. Treći se korak može podijeliti u nekoliko faza: fazu nukleacije, fazu rasta kristala i fazu završetka rasta kristala. Dovođenjem otopine u stanje prezasićenosti ispunjen je osnovni uvjet za početak nukleacije te nastaju mali agregati odnosno nukleusi. Te se male jezgre stvaraju u nestabilnoj zoni prezasićene otopine. Vrlo je važno dobro odrediti pogodnu koncentraciju proteina jer prevelika koncentracija proteina može dovesti do stvaranja amorfnog precipitata i gubitka proteina. Kako se koncentracija otapala smanjuje, a koncentracija precipitanta raste, raste i nukleus te se uslijed smanjenja koncentracije otopljenog proteina nukleus pomiče iz nestabilne zone u metastabilnu zonu gdje se odvija rast kristala (slika 10). Ukoliko su stvoreni povoljni uvjeti za nukleaciju ona može dovesti do stvaranja velikog broja kristalnih jezgri. Kako bi iz kristalne jezgre nastao kristal, jezgra mora prvo narasti na određenu veličinu koju nazivamo kritična veličina. Kritična veličina opisuje se omjerom površine i

volumena jezgre. Ako jezgra postigne kritičnu veličinu iz nje će nastati kristal, no ukoliko je jezgra manja od kritične veličine dolazi do spontanog otapanja i prestanka postupka kristalizacije.

Najbolji rast kristala postiže se smanjenjem prezasićenja. Velikim prezasićenjem može nastati velik broj kristalnih jezgri te rezultirati rastom velikog broja manjih kristala ili nastankom amorfnog taloga. Također rast kristala mora biti što sporiji i homogeniji jer se u takvim uvjetima molekule i atomi polagano i pravilno orijentiraju pri čemu stvaraju pravilnu i simetričnu mrežu tj. kristalnu strukturu.

Precipitanti poput PEG-a te raznih soli imaju visok afinitet prema vodi i mogu ju imobilizirati i na taj način smanjuju topljivost proteina. Topljivost proteina može se regulirati isoljavanjem (engl. *salting out*) i usoljavanjem (engl. *salting in*). Isoljavanjem se smanjuje ionska jakost otopine, dolazi do gubitka nabijenih iona te započinje stvaranje protein-protein interakcija što dovodi do pada topljivosti i stvaranja proteinskog precipitata. S druge strane usoljavanjem, povećava se ionska jakost otopine, a samim time i topljivost proteina te se pospešuje proces kristalizacije. Osim isoljavanjem i usoljavanjem topljivost proteina može se regulirati i promjenom pH otopine i promjenom temperature.

## 2.6. Metode kristalizacije

Od začetaka kristalografije pa do danas razvilo se nekoliko metoda kristalizacije proteina: tehnika difuzije iz tekućine u tekućinu, tehnika difuzije para, tehnika dijalize i „batch“ metoda (engl. *batch* – serija, šarža).

Tehnikom difuzije iz tekućine u tekućinu otopina proteina i otopina u kojoj je taložni reagens stavljaju se u kapilaru pomoću igle. Između slojeva otopina stvara se granica, a otopine postepeno difundiraju jedna u drugu.

Tehnika difuzije para može se napraviti na dva načina, kao metoda viseće kapi (slika 11, B) ili metoda sjedeće kapi (slika 11, A). Kod metode viseće kapi u spremniku za kristalizaciju nalazi se matičnica (precipitarna otopina), nad nju se postavlja silikonizirano stakalce na kojem se nalazi kap nastala miješanjem određenog volumena matičnice i određenog

volumena otopine proteina (najčešće u omjeru 1:1). Cijeli sustav dobro se zatvori kako bi bio hermetički zatvoren i kako bi se spriječilo isparavanje otopine iz spremnika. Princip kristalizacije metodom difuzije para viseće i sjedeće kapi je isti no metoda sjedeće kapi koristi se za kristalizaciju proteina iz otopina male površinske napetosti i to iz jednostavnog razloga da ne dođe do prolijevanja kapljice sa stakalca.



Slika 11. Prikaz metode sjedeće kapi (A), prikaz metode viseće kapi (B)<sup>16</sup>

Tehnika dijalize metoda je kristalizacije kod koje se ne mijenja koncentracija proteina. Do kristalizacije dolazi zbog difuzije molekula liganda kroz polupropusnu membranu jer dolazi do prezasićenja molekula proteina unutar membrane. Ovisno o količini dostupnog proteina ova se metoda može raditi u cjevčici za dijalizu ili u mikrokapilarama.

„Batch“ metoda najstarija je i ujedno i najjednostavnija metoda kristalizacije proteina. Taložni reagens dodaje se u otopinu proteina. Otopina postaje prezasićena čime su postignuti uvjeti za početak kristalizacije. Kao i kod metode para sustav je hermetički zatvoren kako bi se spriječilo isparavanje.

## 2.7. Kristali

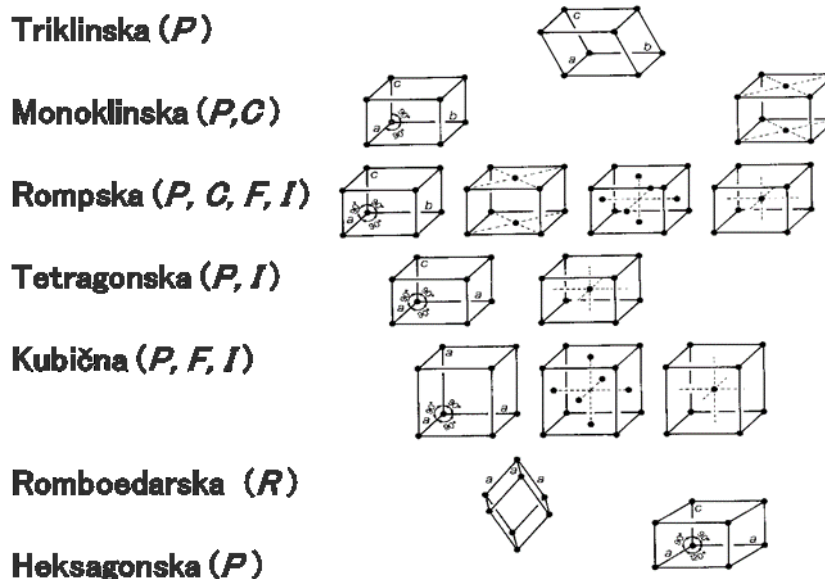
Kristali su trodimenzionalni periodički rasporedi molekula, atoma i/ili iona koji imaju određen oblik i karakteristična svojstva. Svaki kristal možemo svrstati u jednu od 230 prostornih grupa, u jednu od 32 točkaste grupe, u jednu od 14 Bravaisovih rešetki odnosno u jedan od 7 kristalnih sustava.

Kristale opisujemo:

- jediničnom ćelijom - osnovna jedinica koja gradi kristal.
- prostornom rešetkom - to je prostorni periodični raspored točaka u kojemu svaka točka predstavlja strukturni motiv definiran trima vektorima periodičnost (to su bridovi jedinične ćelije koji su paralelni s rotacijskim osima ili su okomiti na ravnine simetrije, a s pomoću kojih se translacijom početne točke čvora izgrađuje cijela rešetka). Prostornu rešetku čine jedinične ćelije.
- kristalografskim osima - one određuju koordinatni sustav unutar kristala. Razlikujemo osi drugog, trećeg, četvrtog i šestog reda.
- kristalnim sustavom - na temelju osi i kutova među kristalografskim osima razlikujemo sedam kristalnih sustava (tablica 2).
- Bravaisovim rešetkama - to je beskonačni raspored diskretnih točaka s takvim međusobnim rasporedom i orijentacijom da okolina oko bilo koje točke uvijek izgleda potpuno jednako bez obzira iz kojeg se smjera promatra (slika 12).

Tablica 2. Podjela kristalnih obitelji i kristalnih sustava

<i>kristalna obitelj</i>	<i>kristalni sustav</i>	<i>potrebni element simetrije</i>	<i>broj točaka geometrija</i>	<i>broj prostornih grupa</i>
triklinska	triklinski	-	2	2
monoklinska	monoklinski	jedna os 2. reda ili <i>m</i>	3	13
rompska	rompski	tri osi 2. reda ili jedna os 2. reda i dvije <i>m</i>	3	59
tetragonska	tetragonski	jedna os 4. reda	7	68
heksagonska	trigonski	jedna os 3. reda	5	25
heksagonska	heksagonski	jedna os 6. reda	7	27
kubična	kubični	četiri osi 3. reda	5	36
<i>UKUPNO</i>			32	230



Slika 12. Prikaz 14 Bravaisovih rešetki (P – primitivna ili jednostavna rešetka, C – bazno centrirana; F – plošno centrirana; I – prostorno/volumno centrirana; R – trigonska)

Proteini ne kristaliziraju u svih 230 prostornih grupa zato što primjenom zrcalne ravnine i centra inverzije dolazi do prelaska L-aminokiseline u D-aminokiselinu, a kao što znamo proteini su građeni isključivo od L-aminokiselina. Kod kristala proteina dozvoljene su samo one prostorne grupe koje sadrže rotacijske osi ili vijčane osi.<sup>17,18</sup>

## 2.8. Rentgenska strukturna analiza

Kako bi se mogao podvrgnuti rentgenskoj strukturnoj analizi kristal mora biti odgovarajuće kvalitete i veličine. Rentgenska strukturna analiza temelji se na rentgenskim zrakama, elektromagnetskim valovima valne duljine između  $10^{-8}$  do  $10^{-11}$  m koji se raspršuju na elektronima odnosno daju nam podatke o elektronskoj gustoći atoma u kristalu. Rentgenske zrake ne otklanjaju se niti u električnom ni u magnetskom polju, ali ogibom svjetlosti u kristalu mijenjaju smjer širenja. Prolaskom kroz kristal rentgenske zrake se ogibaju i dolazi do interferencije te dobijemo sliku difrakcijskih maksimuma. Iz slike difrakcijskih maksimuma računamo mapu elektronske gustoće prema kojoj možemo odrediti kristalnu strukturu.

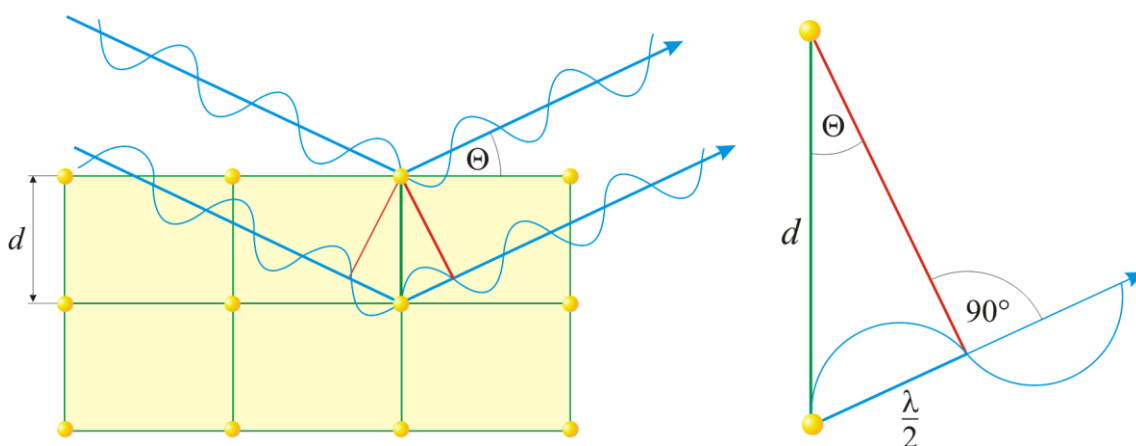
Difrakcijom se detektiraju samo oni valovi koji se raspršuju u fazi tj. koji konstruktivno interferiraju. Difrakcija se događa samo ako je zadovoljen Braggov zakon<sup>19</sup>, slika 13, koji glasi:

$$2d_{hkl} \sin \vartheta = n\lambda$$

gdje je  $d_{hkl}$  razmak između dvije susjedne ravnine (Millerove ravnine),  $\vartheta$  je kut upada snopa rentgenskih zraka,  $\lambda$  - valna duljina rentgenskog zračenja i  $n$  - cijeli broj, red difrakcije.

Konstruktivna interferencija se događa ako i samo ako je  $n$  cijeli broj.

Difrakcija rentgenskih zraka na monokristalu daje nam informaciju o kristalnoj strukturi. Kako bi se difrakcijska slika kristala mogla pravilno interpretirati poželjno je imati monokristal koji mora biti određene veličine (unutar granica određenih promjerom snopa rentgenskih zraka).



Slika 13. Braggov zakon



## § 3. EKSPERIMENTALNI DIO

### 3.1. Priprema otopine pufera

Koristio se pufer natrijev citrat. Za pripremu 0,1 M otopine pufera bilo je potrebno pripremiti vodenu otopinu limunske kiseline i vodenu otopinu soli natrijevog citrata. Odvagano je 768,52 mg limunske kiseline ( $C_6H_8O_7$ ) molekulske mase  $192,13 \text{ g mol}^{-1}$  i nadopunjeno s 35 mL destilirane vode. Na taj način pripremljena je 1 M otopina limunske kiseline. Nakon toga odvagano je 1032,28 mg natrijevog citrata dihidrata ( $Na_3C_6H_5O_7$ ) molekulske mase  $258,07 \text{ g mol}^{-1}$  i nadopunjeno do 40 ml destiliranom vodom. Dobivena je 1 M otopina natrijevog citrata. pH vrijednost pufera korigirana je 10 M otopinom NaOH dok nije dobivena otopina vrijednosti pH 6,8.

### 3.2. Priprema otopina liganda (malih kiralnih molekula)

Ispitana je topljivost polaznih sustanci u destiliranoj vodi. Levodopa i dekstrodoopa topljivi su u vodi uz dodatak klorovodične kiseline (0,5 M klorovodična kiselina). Labetalol se teško otapao u vodi, dok su ostali spojevi topljivi u vodi.

Pripremljena je 0,2 M otopina levodopa na način da je odvagano je 23,43 mg levodopa molekulske mase  $197,19 \text{ g mol}^{-1}$  i otopljeno u 590  $\mu\text{L}$  destilirane vode uz dodatak 20  $\mu\text{L}$  0,5 M klorovodične kiseline.

Za pripremu otopine D-dopa ( $M_r = 197,19 \text{ g mol}^{-1}$ ) odvagano je 21,16 mg supstance te otopljeno u 535  $\mu\text{L}$  destilirane vode uz dodatak 20  $\mu\text{L}$  0,5 M klorovodične kiseline. Dobivena je 0,2 M otopina D-dope.

0,2 M otopina prometazina (molekulska masa  $284,42 \text{ g mol}^{-1}$ ) napravljena je vaganjem je 12,87 mg prometazina te je Eppendorfova epruveta nadopunjena s 220  $\mu\text{L}$  destilirane vode.

Otapanjem 20,26 mg labetalola ( $M_r = 328,41 \text{ g mol}^{-1}$ ) u 309  $\mu\text{L}$  destilirane vode dobivena je pjenasta suspenzija. Labetalol je bio u grudicama koje su se teško topile i uz snažno miješanje na miješalici.

Od izvaganog propranolola, 5,19 mg, molekulske mase  $259,34 \text{ g mol}^{-1}$ , napravljena je vodena otopina otapanjem u 100  $\mu\text{L}$  destilirane vode. Dobivena otopina bila je koncentracije 0,2 M.

Propranolol-HCl, 1,47 mg, otopljen je u 25  $\mu\text{L}$  destilirane vode i tako je dobivena 0,2 M otopina.

### 3.3. Priprema otopine apotransferina

Vodena otopina apotransferina dobivena je tako da se odvagalo 3,00 mg proteina ( $M_r = 80 \text{ kD}$ ) te je otopljen u 60  $\mu\text{L}$  destilirane vode. Kristali apotransferina dobiveni su kristalizacijom prema shemi u tablici 3.

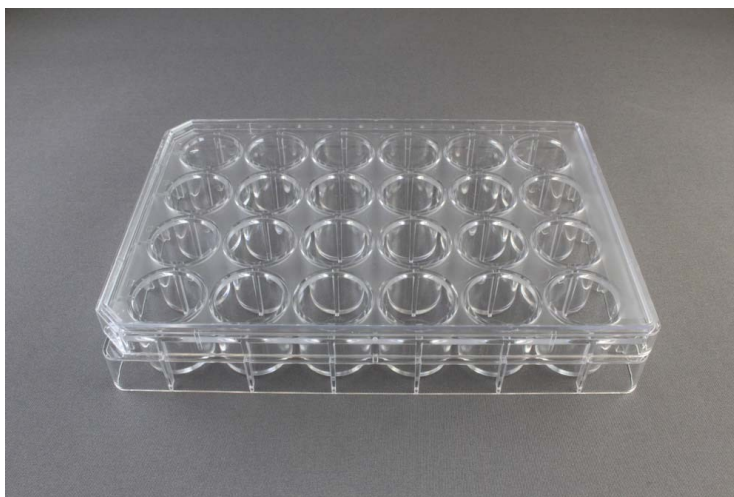
Tablica 3. Volumeni otopina i vode u precipitantnim otopinama za kristalizaciju apotransferina

140 uL 50 % PEG	150 uL 50 % PEG	160 uL 50 % PEG	170 uL 50 % PEG	180 uL 50 % PEG	190 uL 50 % PEG
50.0 uL 1 M MES pH=6.5	50.0 uL 1 M MES pH=6.5	50.0 uL 1 M MES pH=6.5	50.0 uL 1 M MES pH=6.5	50.0 uL 1 M MES pH=6.5	50.0 uL 1 M MES pH=6.5
75.00 uL 1 M natrijev citrat	75.00 uL 1 M natrijev citrat	75.00 uL 1 M natrijev citrat	75.00 uL 1 M natrijev citrat	75.00 uL 1 M natrijev citrat	75.00 uL 1 M natrijev citrat
235.00 uL H <sub>2</sub> O	225.00 uL H <sub>2</sub> O	215.00 uL H <sub>2</sub> O	205.00 uL H <sub>2</sub> O	195.00 uL H <sub>2</sub> O	185.00 uL H <sub>2</sub> O
140 uL 50 % PEG	150 uL 50 % PEG	160 uL 50 % PEG	170 uL 50 % PEG	180 uL 50 % PEG	190 uL 50 % PEG
50.0 uL 1 M HEPES pH=6.8	50.0 uL 1 M HEPES pH=6.8	50.0 uL 1 M HEPES pH=6.8	50.0 uL 1 M HEPES pH=6.8	50.0 uL 1 M HEPES pH=6.8	50.0 uL 1 M HEPES pH=6.8
75.00 uL 1 M natrijev citrat	75.00 uL 1 M natrijev citrat	75.00 uL 1 M natrijev citrat	75.00 uL 1 M natrijev citrat	75.00 uL 1 M natrijev citrat	75.00 uL 1 M natrijev citrat
235.00 uL H <sub>2</sub> O	225.00 uL H <sub>2</sub> O	215.00 uL H <sub>2</sub> O	205.00 uL H <sub>2</sub> O	195.00 uL H <sub>2</sub> O	185.00 uL H <sub>2</sub> O
140 uL 50 % PEG	150 uL 50 % PEG	160 uL 50 % PEG	170 uL 50 % PEG	180 uL 50 % PEG	190 uL 50 % PEG
50.0 uL 1 M HEPES pH=7.0	50.0 uL 1 M HEPES pH=7.0	50.0 uL 1 M HEPES pH=7.0	50.0 uL 1 M HEPES pH=7.0	50.0 uL 1 M HEPES pH=7.0	50.0 uL 1 M HEPES pH=7.0
75.00 uL 1 M natrijev citrat	75.00 uL 1 M natrijev citrat	75.00 uL 1 M natrijev citrat	75.00 uL 1 M natrijev citrat	75.00 uL 1 M natrijev citrat	75.00 uL 1 M natrijev citrat
235.00 uL H <sub>2</sub> O	225.00 uL H <sub>2</sub> O	215.00 uL H <sub>2</sub> O	205.00 uL H <sub>2</sub> O	195.00 uL H <sub>2</sub> O	185.00 uL H <sub>2</sub> O
140 uL 50 % PEG	150 uL 50 % PEG	160 uL 50 % PEG	170 uL 50 % PEG	180 uL 50 % PEG	190 uL 50 % PEG
50.0 uL 1 M HEPES pH=7.0	50.0 uL 1 M HEPES pH=7.0	50.0 uL 1 M HEPES pH=7.0	50.0 uL 1 M HEPES pH=7.0	50.0 uL 1 M HEPES pH=7.0	50.0 uL 1 M HEPES pH=7.0
75.00 uL 1 M natrijev citrat	75.00 uL 1 M natrijev citrat	75.00 uL 1 M natrijev citrat	75.00 uL 1 M natrijev citrat	75.00 uL 1 M natrijev citrat	75.00 uL 1 M natrijev citrat
235.00 uL H <sub>2</sub> O	225.00 uL H <sub>2</sub> O	215.00 uL H <sub>2</sub> O	205.00 uL H <sub>2</sub> O	195.00 uL H <sub>2</sub> O	185.00 uL H <sub>2</sub> O

### 3.4. Postupak kristalizacije

Za kristalizaciju proteina koristila se tehnika difuzije para viseće kapi. Za korištenje ove metode odlučilo se iz više razloga: 1.) zbog male količine dostupnog proteina, 2.) na jednoj kristalizacijskoj ploči moguće je izvesti više različitih kristalizacija te 3.) zbog male dimenzije i lakog baratanja s kristalizacijskim pločama.

Kristalizacijske otopine postavljene su u kristalizacijske ploče veličine 4x6 spremnika proizvođača Hampton-Research. Slika 14 prikazuje kristalizacijsku ploču proizvođača Hampton-Research. Spremnici su označeni okomito slovima od A do D i vodoravno brojevima od 1 do 6 radi lakšeg praćenja.



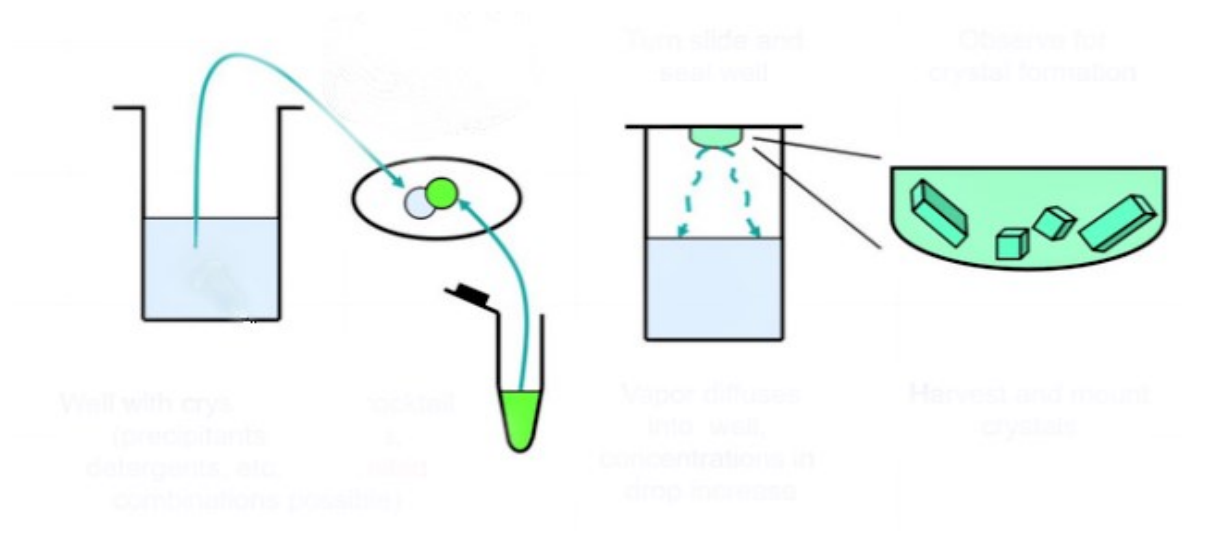
Slika 14. Ploča za kristalizaciju s 4x6 spremnika

U svaki spremnik stavljeno je 1 mL otopine precipitantne otopine („matičnice“) prema shemi iz tablice 4. Na silikonizirano stakalce (stakalce je silikonizirano kako bi se spriječilo razlijevanje kapi) prvo je postavljena kap otopine proteina volumena 1  $\mu\text{L}$ . U tu kap dodana je kap otopine matičnice volumena 1,5  $\mu\text{L}$  iz spremnika iznad kojeg će se nalaziti stakalce (slika 16). Tako pripremljena stakalca postavljena su na spremnik. Spremnici imaju ravnu gornju površinu koja je premazana sa silikonskom masti kako bi se hermetički zatvorili čime se sprečava isparavanje otopine matičnice. Otopina labetalola nije bila čista otopina, u njoj su se zadržale sitne grudice te nije bilo moguće staviti „čistu“ otopinu na stakalce. Zbog vrlo male

količine otopine propranolol hidroklorida, svega 25 µL, došlo je do gubitka otopine kada je u tips pipete ušao zrak.

Tablica 4. Shema postavljenih uvjeta kristalizacije apotransferina s malim kiralnim molekulama

<b>A1</b> 340 uL 50 M PEG 3350 100.0 uL 1 M MES pH=6.5 100.0 uL 1 M natrijev citrat 50.00 uL 0.2 M D-dopa 410.00 uL H <sub>2</sub> O	<b>B1</b> 340 uL 50 M PEG 3350 100.0 uL 1 M MES pH=6.5 100.0 uL 1 M natrijev citrat 50.00 uL 0.2 M L-dopa 410.00 uL H <sub>2</sub> O	<b>C1</b> 340 uL 50 M PEG 3350 100.0 uL 1 M MES pH=6.5 100.0 uL 1 M natrijev citrat 50.00 uL 0.2 M prometazin 410.00 uL H <sub>2</sub> O	<b>D1</b> 340 uL 50 M PEG 3350 100.0 uL 1 M MES pH=6.5 100.0 uL 1 M natrijev citrat 50.00 uL 0.2 M labetalol 410.00 uL H <sub>2</sub> O	<b>E1</b> 340 uL 50 M PEG 3350 100.0 uL 1 M MES pH=6.5 100.0 uL 1 M natrijev citrat 50.00 uL 0.2 M propranolol-HCl 410.00 uL H <sub>2</sub> O	<b>F1</b> 340 uL 50 M PEG 3350 100.0 uL 1 M MES pH=6.5 100.0 uL 1 M natrijev citrat 50.00 uL 0.2 M propranolol 410.00 uL H <sub>2</sub> O
<b>A2</b> 340 uL 50 M PEG 3350 100.0 uL 1 M MES pH=6.5 100.0 uL 1 M natrijev citrat 50.00 uL 0.2 M D-dopa 410.00 uL H <sub>2</sub> O	<b>B2</b> 340 uL 50 M PEG 3350 100.0 uL 1 M MES pH=6.5 100.0 uL 1 M natrijev citrat 50.00 uL 0.2 M L-dopa 410.00 uL H <sub>2</sub> O	<b>C2</b> 340 uL 50 M PEG 3350 100.0 uL 1 M MES pH=6.5 100.0 uL 1 M natrijev citrat 50.00 uL 0.2 M prometazin 410.00 uL H <sub>2</sub> O	<b>D2</b> 340 uL 50 M PEG 3350 100.0 uL 1 M MES pH=6.5 100.0 uL 1 M natrijev citrat 50.00 uL 0.2 M labetalol 410.00 uL H <sub>2</sub> O	<b>E2</b> 340 uL 50 M PEG 3350 100.0 uL 1 M MES pH=6.5 100.0 uL 1 M natrijev citrat 50.00 uL 0.2 M propranolol-HCl 410.00 uL H <sub>2</sub> O	<b>F2</b> 340 uL 50 M PEG 3350 100.0 uL 1 M MES pH=6.5 100.0 uL 1 M natrijev citrat 50.00 uL 0.2 M propranolol 410.00 uL H <sub>2</sub> O
<b>A3</b> 340 uL 50 M PEG 3350 100.0 uL 1 M MES pH=6.5 100.0 uL 1 M natrijev citrat 50.00 uL 0.2 M D-dopa 410.00 uL H <sub>2</sub> O	<b>B3</b> 340 uL 50 M PEG 3350 100.0 uL 1 M MES pH=6.5 100.0 uL 1 M natrijev citrat 50.00 uL 0.2 M L-dopa 410.00 uL H <sub>2</sub> O	<b>C3</b> 340 uL 50 M PEG 3350 100.0 uL 1 M MES pH=6.5 100.0 uL 1 M natrijev citrat 50.00 uL 0.2 M prometazin 410.00 uL H <sub>2</sub> O	<b>D3</b> 340 uL 50 M PEG 3350 100.0 uL 1 M MES pH=6.5 100.0 uL 1 M natrijev citrat 50.00 uL 0.2 M labetalol 410.00 uL H <sub>2</sub> O	<b>E3</b> 340 uL 50 M PEG 3350 100.0 uL 1 M MES pH=6.5 100.0 uL 1 M natrijev citrat 50.00 uL 0.2 M propranolol-HCl 410.00 uL H <sub>2</sub> O	<b>F3</b> 340 uL 50 M PEG 3350 100.0 uL 1 M MES pH=6.5 100.0 uL 1 M natrijev citrat 50.00 uL 0.2 M propranolol 410.00 uL H <sub>2</sub> O
<b>A4</b> 340 uL 50 M PEG 3350 100.0 uL 1 M MES pH=6.5 100.0 uL 1 M natrijev citrat 50.00 uL 0.2 M D-dopa 410.00 uL H <sub>2</sub> O	<b>B4</b> 340 uL 50 M PEG 3350 100.0 uL 1 M MES pH=6.5 100.0 uL 1 M natrijev citrat 50.00 uL 0.2 M L-dopa 410.00 uL H <sub>2</sub> O	<b>C4</b> 340 uL 50 M PEG 3350 100.0 uL 1 M MES pH=6.5 100.0 uL 1 M natrijev citrat 50.00 uL 0.2 M prometazin 410.00 uL H <sub>2</sub> O	<b>D4</b> 340 uL 50 M PEG 3350 100.0 uL 1 M MES pH=6.5 100.0 uL 1 M natrijev citrat 50.00 uL 0.2 M labetalol 410.00 uL H <sub>2</sub> O	<b>E4</b> 340 uL 50 M PEG 3350 100.0 uL 1 M MES pH=6.5 100.0 uL 1 M natrijev citrat 50.00 uL 0.2 M propranolol-HCl 410.00 uL H <sub>2</sub> O	<b>F4</b> 340 uL 50 M PEG 3350 100.0 uL 1 M MES pH=6.5 100.0 uL 1 M natrijev citrat 50.00 uL 0.2 M propranolol 410.00 uL H <sub>2</sub> O



Slika 15. Postupak kristalizacije metodom difuzije para viseće kapi.

Nakon što su na sva stakalca postavljene kapi otopine proteina i otopine iz odgovarajućeg spremnika, stakalca su postavljena nad odgovarajući spremnik te su hermetički zatvoreni, slika 15. Pod mikroskopom se zatim provjerilo je li možda kristalizacija već započeta u pojedinim kapljicama (tablica 5).

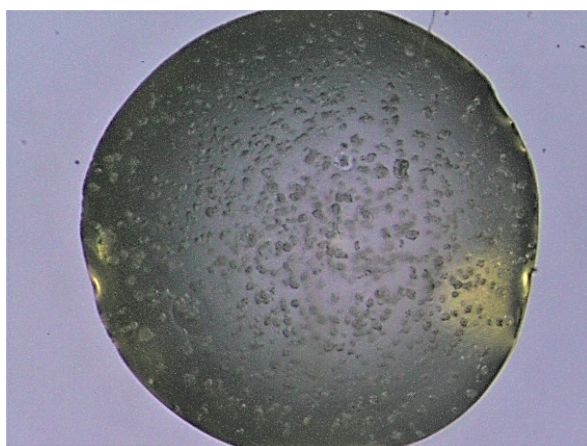
Tablica 4. Opažanja neposredno nakon postavljene kristalizacije

A1 – zamućena otopina	B1 – zamućena otopina	C1 – mjehurići zraka nalaze se u kapljici, po obodu se počela stvarati korica	D1 – zamućena otopina	E1 – zamućena otopina	F1 – zamućena otopina
A2 – zamućena otopina	B2 – zamućena otopina	C2 – vidljivo je onečišćenje kapljice	D2 – vidi se grudica labetalola u otopini	E2 – zamućena otopina	F2 – zamućena otopina
A3 – bistra otopina	B3 – zamućena otopina	C3 – u kapljici se nalazi velik broj mjehurića zraka	D3 – vidi se grudica labetalola u otopini	E3 – zamućena otopina	F3 – bistra otopina
A4 – zamućena otopina	B4 – bistra otopina	C4 – zamućena otopina	D4 – vidi se grudica labetalola u otopini	E4 – zamućena otopina	F4 – zamućena otopina

Tako pripremljeni kristalizacijski spremnik stavljen je da stoji na stalnoj temperaturi od 20 °C 14 dana.

## § 4. REZULTATI I RASPRAVA

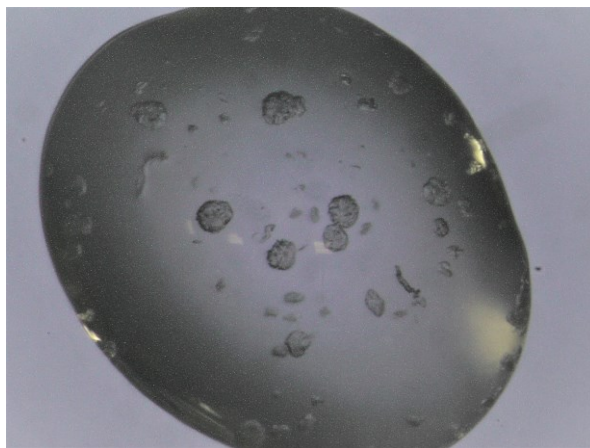
Nakon 14 dana kristalizacijski spremnik postavljen je pod mikroskop te su zabilježene oznake spremnika gdje su nastali kristali. Dobiveni su sljedeći rezultati u kojim je vidljivo da su u spremniku A1, slika 16, u kojem se odvijala kristalizacija apotransferina s dekstrodompom nastali sitni kristalići proteinskog kompleksa. Dobiveni kristalići presitni su za daljnje ispitivanje odnosno difrakciju rentgenskih zraka. U ostalim spremnicima A2, A3 i A4, a u kojima je također bila otopina dekstrode došlo je do kristalizacije, ali ne monokristala već sraslaca koji također nisu bili pogodni za daljnje ispitivanje.



Slika 16. Nastali kristalići apotransferina s D-dopom u spremniku A1

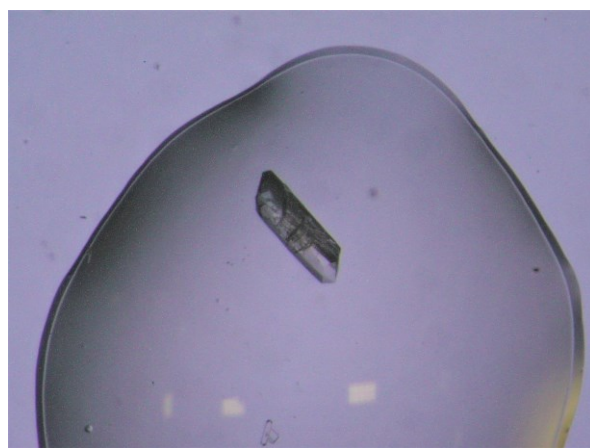
U spremnicima C1, C2 i C3, gdje se odvijala kristalizacija apotransferina s prometazinom, nastali su kristalići, sraslaci, nepogodni za daljnje ispitivanje. Slika 17 prikazuje nastale kristaliće u spremniku C3. U spremniku C4 nije došlo do stvaranja kristala.



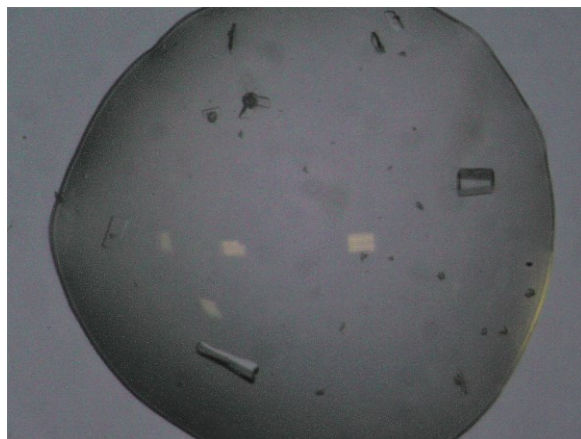


Slika 17. Sraslaci apotransferina i prometazina iz kristalizacijskog spremnika označenog s oznakom C3

Slika 18 prikazuje nastali monokristal apotransferina i propranolol hidroklorida iz spremnika E4. Dobiveni monokristal nije pogodne kvalitete za daljnje ispitivanje niti podvrgavanje rentgenskoj strukturnoj analizi jer kao što se i vidi sa slike, monokristal je napuknuo. U ostalim spremnicima u kojima se nalazio propranolol hidroklorid i apotransferin nije došlo do kristalizacije.

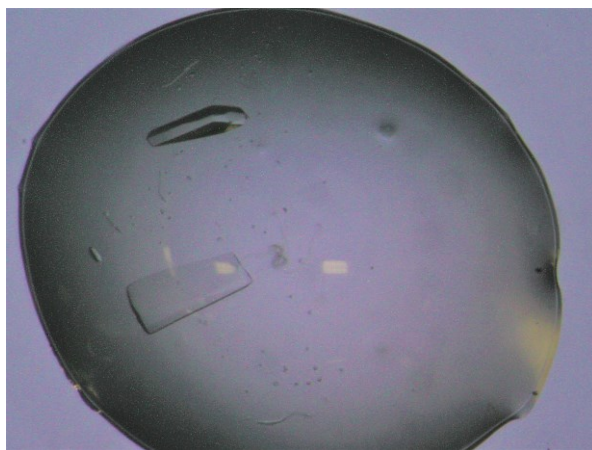


Slika 18. Monokristal apotransferina i propranolol-HCl-a nastalog u kristalizacijskom spremniku E4

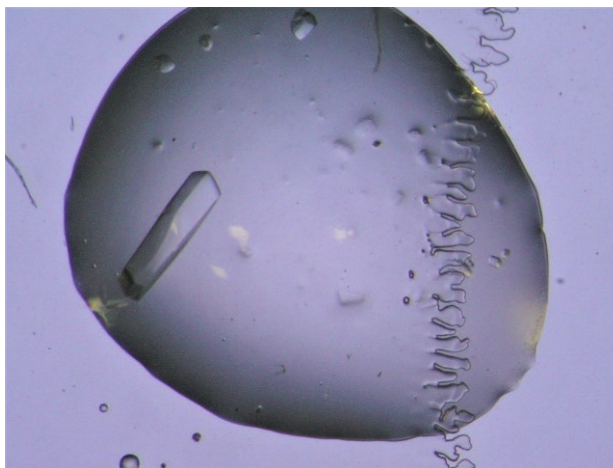


Slika 19. Kristali apotransfeina i propranolola nastali u spremniku označenim kao F3

U stupcu označenom slovom F postavljani su uvjeti kristalizacije apotransferina i propranolola. Na slici 19 prikazani su nastali monokristali, dva manja pravilnog oblika te jedan veći nepravilnog oblika. U istoj kapljici nastalo je i nekoliko sitnijih nakupina sraslaca. Na slici 20 prikazani su nastali kristali u spremniku kristalirke označene oznakom F4. Nastao je jedan veći monokristal pravilnijeg oblika te jedan manji nepravilnog oblika. U druga dva spremnika ploče označenih kao F1 i F2 nastali su sraslaci.



Slika 20. Kristali apotransferina i propranolola u spremniku označenom s oznakom F4



Slika 21. Monokristal apotransferina i L-dope nastalog u spremniku označenom s oznakom B1

Slika 21 prikazuje monokristal apotransferina i levodope. Nastali monokristal dobre je kvalitete i može se podvrgnuti rentgenskoj strukturnoj analizi. U spremniku s oznakom B2 nastali su sraslaci, dok su otopine u spremnicima B2 i B4 bile crno obojene.

U spremnicima s labetalolom, označeno oznakama od D1 do D4, nije došlo do kristalizacije.

## § 5. ZAKLJUČAK

U ovom diplomskom radu opisan je postupak kristalizacije derivata apotransferina s malim kiralnim molekulama: L-dopom, D-dopom, prometazinom, labetalolom, propranololom i propranolol-HCl-om. Uzorak derivata apotransferina otopljen je u redestiliranoj vodi kako bi se dobila 0,2 M otopina (topljivost apotransferina iznosi 50 mg/ml). Pripremljene su i 0,2 M otopine malih királnih molekula otapanjem u redestiliranoj vodi, odnosno u slučaju L-dopa, D-dopa otapanje je izvršeno u redestiliranoj vodi uz dodatak konc. HCl. Pripremljena je i 1 M otopina pufera natrijevog citrata. U postupku kristalizacije koristile su se još i 50 % PEG 3350 i 1 M otopina MES-a pH=6.5.

Za kristalizaciju se koristila metoda difuzije para točnije metoda kristalizacije viseće kapi i to na način da se na silikonizirano stakalce stavila kap volumena 1  $\mu$ l te se dodala kap precipitacijske otopine volumena 1,5  $\mu$ l. Silikonizirano stakalce postavljeno je iznad spremnika s precipitacijskom otopinom. Tako pripremljena kristalizacijska ploča stavljena je na temperaturu od 20 °C. Nakon 14 dana provjerom kristalizacijske ploče pod mikroskopom utvrđeno je da su iz otopine s D-dopom nastali sraslaci i mikrokristali, s otopinom u koju je dodana L-dopa u jednom od spremnika nastao monokristal (precipitacijska otopina spremnika sadržavala je 340  $\mu$ l 50 % PEG 3350, 100  $\mu$ l 1 M MES pH=6,5, 100  $\mu$ l 1 M natrijev citrat, 50  $\mu$ l otopine L-dopa i 410  $\mu$ l redestilirane vode), u jednom spremniku nastali su sraslaci, a druga dva spremnika u kojima se nalazila levodopa bila su crno obojena. Otopina se obojila jer je u kontaktu sa zrakom labetalol oksidirao. U spremniku u redu C, gdje se odvijala kristalizacija apotransferina s prometazinom nastali su sraslaci, dok u spremniku u redu D, u kojem je bio apotransferin i labetalol nisu nastali niti sraslaci ni monokristal. Kristalizacijom apotransferina i propranolol-hidroklorida u tri spremnika nastali su sraslaci, dok su u jednom spremniku nastali monokristali, no bili su premaleni za daljnju obradu. U dva spremnika s propranololom nastali su sraslaci, a u ostala dva spremnika nastalo je nekoliko kristala, neki od kojih su bili pravilnog odnosno nepravilnog oblika.

Kako bi potvrdili da su u navedenim spremnicima nastali upravo kristali apotransferina s levodopom, propranololom i propranolol hidrokloridom isti moraju biti podvrgnuti

rentgenskoj strukturnoj analizi odnosno nekom drugom postupku, a koji bi nam dao podatke o točnom sastavu nastalih kristala.

Ovim radom pokazano je da na nastanak kristala odnosno kristalizaciju utječe velik broj različitih utjecaja, od kojih su neki: čistoća i količina polaznih supstanci, temperatura, pH, koncentracija precipitacijske otopine. Iako sam postupak izgleda jednostavno, kristalizacija je uistinu složen proces u kojem, ukoliko želimo dobiti kristal pogodne kvalitete za daljnju obradu, moramo pripaziti na velik broj uvjeta koji su često zavisni i/ili nezavisni jedni o drugima.

Kako je u nekim od spremnika došlo do kristalizacije i do stvaranja monokristala dobiveni rezultati koristiti će u daljnjim istraživanjima o načinu vezanja malih kiralnih molekula na apotransferin.

## § 6. POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA

apoTf – apotransferin

oTf – ovotransferin

sTf – serumski transferin

lTf – laktotransferin

PEG – polietilen glikol

HEPES - [4-(2-hidroksietil)-1-piperazinil]etansulfonska kiselina

MES - 2-(N-morfolino)etansulfonska kiselina

## § 7. LITERATURNI IZVORI

1. K. Mizutani, H. Yamashita, H. Kurokawwa, B. Mikami, M. Hirose, *J. Biol. Chem.*
2. F. Kilar, B. Visegrady, *Electrophoresis* **23** (2002) 964-971.
3. P. Karson, *Biokemija*, Školska knjiga, Zagreb, 1993
4. J. M. Berg, J. L. Tymoczko, L. Stryer, *Biochemistry (5th edition)*, Freeman, New York, 2002.
5. I. Filipović, S. Lipanović, *Opća i anorganska kemija*, Školska knjiga, Zagreb, 1995.
6. I. G. Bertini, B. Harry, S. J. Lippard, J. S. Valentine *Bioinorganic Chemistry*, 1994., University Science Books, Mill Valley, CA., 1-35
7. F. Yangt, J. B. Lumt, J. R. McGillt, C. M. Mooret, S. L. Naylort, P. H. Van Bragtt, W. D. Baldwint, B. H. Bowmant *Proc. Natl. Acad. Sci.* **81** (1984) 2752-2756
8. <https://www.rcsb.org/structure/3qyt> (datum pristupa 15.09.2019.)
9. <https://www.rcsb.org/structure/1a8f> (datum pristupa 15.09.2019.)
10. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Levodopa> (datum pristupa 15.09.2019.)
11. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/D-Dopa> (datum pristupa 15.09.2019.)
12. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/4946> (datum pristupa 15.09.2019.)
13. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/62882#section=2D-Structure> (datum pristupa 15.09.2019.)
14. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Promethazine> (datum pristupa 15.09.2019.)
15. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Labetalol#section=IUPAC-Name> (datum pristupa 15.09.2019.)
16. <https://biotechmind.wordpress.com/2015/06/17/ada-yonath-cristalografia-rayos-x-ray-crystallography/drop-methods/> (datum pristupa 15.09.2019.)
17. <http://geol.pmf.hr/~dtibljias/Min-1.pdf> (datum pristupa 15.09.2019.)
18. <http://geol.pmf.hr/~dtibljias/Min-2.pdf> (datum pristupa 15.09.2019.)
19. <https://glossary.periodni.com/glosar.php?hr=Braggov+kut> (datum pristupa 15.09.2019.)
20. <https://hamptonresearch.com/make-tray.php> (datum pristupa 15.09.2019.)

## § 8. DODATAK

U Dodatku su navedene još neke moguće sheme kristalizacije derivata apotransferina malim kiralnim molekulama korištenjem različitih koncentracija polaznih supstanci

Tablica D1. Shema postavljanja kristalizacije uz pripremu 0,01 M otopina malih kiralnih molekula (samo koncentracije supstancija)

17 M PEG 3350 0.1 M MES pH=6.5 0.1 M natrijev citrat 0.01 M D-dopa	17 M PEG 3350 0.1 M MES pH=6.5 0.1 M natrijev citrat 0.01 M L-dopa	17 M PEG 3350 0.1 M MES pH=6.5 0.1 M natrijev citrat 0.01 M prometazin	17 M PEG 3350 0.1 M MES pH=6.5 0.1 M natrijev citrat 0.01 M labetalol	17 M PEG 3350 0.1 M MES pH=6.5 0.1 M natrijev citrat 0.01 M propranolol-HCl	17 M PEG 3350 0.1 M MES pH=6.5 0.1 M natrijev citrat 0.01 M propranolol
17 M PEG 3350 0.1 M MES pH=6.5 0.1 M natrijev citrat 0.01 M D-dopa	17 M PEG 3350 0.1 M MES pH=6.5 0.1 M natrijev citrat 0.01 M L-dopa	17 M PEG 3350 0.1 M MES pH=6.5 0.1 M natrijev citrat 0.01 M prometazin	17 M PEG 3350 0.1 M MES pH=6.5 0.1 M natrijev citrat 0.01 M labetalol	17 M PEG 3350 0.1 M MES pH=6.5 0.1 M natrijev citrat 0.01 M propranolol-HCl	17 M PEG 3350 0.1 M MES pH=6.5 0.1 M natrijev citrat 0.01 M propranolol
17 M PEG 3350 0.1 M MES pH=6.5 0.1 M natrijev citrat 0.01 M D-dopa	17 M PEG 3350 0.1 M MES pH=6.5 0.1 M natrijev citrat 0.01 M L-dopa	17 M PEG 3350 0.1 M MES pH=6.5 0.1 M natrijev citrat 0.01 M prometazin	17 M PEG 3350 0.1 M MES pH=6.5 0.1 M natrijev citrat 0.01 M labetalol	17 M PEG 3350 0.1 M MES pH=6.5 0.1 M natrijev citrat 0.01 M propranolol-HCl	17 M PEG 3350 0.1 M MES pH=6.5 0.1 M natrijev citrat 0.01 M propranolol
17 M PEG 3350 0.1 M MES pH=6.5 0.1 M natrijev citrat 0.01 M D-dopa	17 M PEG 3350 0.1 M MES pH=6.5 0.1 M natrijev citrat 0.01 M L-dopa	17 M PEG 335 0.1 M MES pH=6.5 0.1 M natrijev citrat 0.01 M prometazin	17 M PEG 3350 0.1 M MES pH=6.5 0.1 M natrijev citrat 0.01 M labetalol	17 M PEG 3350 0.1 M MES pH=6.5 0.1 M natrijev citrat 0.01 M propranolol-HCl	17 M PEG 3350 0.1 M MES pH=6.5 0.1 M natrijev citrat 0.01 M propranolol



Tablica D2. Shema postavljanja kristalizacije uz pripremu 0,1 M otopina malih kiralnih molekula

180 uL 50 % PEG 3350 150.0 uL 1 M natrijev citrat 100.00 uL 0.1 M L-dopa  70.00 uL H <sub>2</sub> O	180 uL 50 % PEG 3350 150.0 uL 1 M natrijev citrat 100.00 uL 0.1 M D-dopa  70.00 uL H <sub>2</sub> O	180 uL 50 % PEG 3350 150.0 uL 1 M natrijev citrat 100.00 uL 0.1 M prometazin  70.00 uL H <sub>2</sub> O	180 uL 50 % PEG 3350 150.0 uL 1 M natrijev citrat 100.00 uL 0.1 M labetalol  70.00 uL H <sub>2</sub> O	180 uL 50 % PEG 3350 150.0 uL 1 M natrijev citrat 100.00 uL 0.1 M propranolol  70.00 uL H <sub>2</sub> O	180 uL 50 % PEG 3350 150.0 uL 1 M natrijev citrat 100.00 uL 0.1 M propranolol-HCl  70.00 uL H <sub>2</sub> O
180 uL 50 % PEG 3350 150.0 uL 1 M natrijev citrat 100.00 uL 0.1 M L-dopa  70.00 uL H <sub>2</sub> O	180 uL 50 % PEG 3350 150.0 uL 1 M natrijev citrat 100.00 uL 0.1 M D-dopa  70.00 uL H <sub>2</sub> O	180 uL 50 % PEG 3350 150.0 uL 1 M natrijev citrat 100.00 uL 0.1 M prometazin  70.00 uL H <sub>2</sub> O	180 uL 50 % PEG 3350 150.0 uL 1 M natrijev citrat 100.00 uL 0.1 M labetalol  70.00 uL H <sub>2</sub> O	180 uL 50 % PEG 3350 150.0 uL 1 M natrijev citrat 100.00 uL 0.1 M propranolol  70.00 uL H <sub>2</sub> O	180 uL 50 % PEG 3350 150.0 uL 1 M natrijev citrat 100.00 uL 0.1 M propranolol-HCl  70.00 uL H <sub>2</sub> O
180 uL 50 % PEG 3350 150.0 uL 1 M natrijev citrat 100.00 uL 0.1 M L-dopa  70.00 uL H <sub>2</sub> O	180 uL 50 % PEG 3350 150.0 uL 1 M natrijev citrat 100.00 uL 0.1 M D-dopa  70.00 uL H <sub>2</sub> O	180 uL 50 % PEG 3350 150.0 uL 1 M natrijev citrat 100.00 uL 0.1 M prometazin  70.00 uL H <sub>2</sub> O	180 uL 50 % PEG 3350 150.0 uL 1 M natrijev citrat 100.00 uL 0.1 M labetalol  70.00 uL H <sub>2</sub> O	180 uL 50 % PEG 3350 150.0 uL 1 M natrijev citrat 100.00 uL 0.1 M propranolol  70.00 uL H <sub>2</sub> O	180 uL 50 % PEG 3350 150.0 uL 1 M natrijev citrat 100.00 uL 0.1 M propranolol-HCl  70.00 uL H <sub>2</sub> O
180 uL 50 % PEG 3350 150.0 uL 1 M natrijev citrat 100.00 uL 0.1 M L-dopa  70.00 uL H <sub>2</sub> O	180 uL 50 % PEG 3350 150.0 uL 1 M natrijev citrat 100.00 uL 0.1 M D-dopa  70.00 uL H <sub>2</sub> O	180 uL 50 % PEG 3350 150.0 uL 1 M natrijev citrat 100.00 uL 0.1 M prometazin  70.00 uL H <sub>2</sub> O	180 uL 50 % PEG 3350 150.0 uL 1 M natrijev citrat 100.00 uL 0.1 M labetalol  70.00 uL H <sub>2</sub> O	180 uL 50 % PEG 3350 150.0 uL 1 M natrijev citrat 100.00 uL 0.1 M propranolol  70.00 uL H <sub>2</sub> O	180 uL 50 % PEG 3350 150.0 uL 1 M natrijev citrat 100.00 uL 0.1 M propranolol-HCl  70.00 uL H <sub>2</sub> O

Tablica D3. Shema postavljanja kristalizacije uz pripremu 0,2 M otopina malih kiralnih molekula

340 uL 50 M PEG 3350 100.0 uL 1 M MES pH=6.5 100.0 uL 1 M natrijev citrat 250.00 uL 0.2 M D-dopa  210.00 uL H <sub>2</sub> O	340 uL 50 M PEG 3350 100.0 uL 1 M MES pH=6.5 100.0 uL 1 M natrijev citrat 250.00 uL 0.2 M L-dopa  210.00 uL H <sub>2</sub> O	340 uL 50 M PEG 3350 100.0 uL 1 M MES pH=6.5 100.0 uL 1 M natrijev citrat 250.00 uL 0.2 M prometazin  210.00 uL H <sub>2</sub> O	340 uL 50 M PEG 3350 100.0 uL 1 M MES pH=6.5 100.0 uL 1 M natrijev citrat 250.00 uL 0.2 M labetalol  210.00 uL H <sub>2</sub> O	340 uL 50 M PEG 3350 100.0 uL 1 M MES pH=6.5 100.0 uL 1 M natrijev citrat 250.00 uL 0.2 M propranolol-HCl  210.00 uL H <sub>2</sub> O	340 uL 50 M PEG 3350 100.0 uL 1 M MES pH=6.5 100.0 uL 1 M natrijev citrat 250.00 uL 0.2 M propranolol  210.00 uL H <sub>2</sub> O
340 uL 50 M PEG 3350 100.0 uL 1 M MES pH=6.5 100.0 uL 1 M natrijev citrat 250.00 uL 0.2 M D-dopa  210.00 uL H <sub>2</sub> O	340 uL 50 M PEG 3350 100.0 uL 1 M MES pH=6.5 100.0 uL 1 M natrijev citrat 250.00 uL 0.2 M L-dopa  210.00 uL H <sub>2</sub> O	340 uL 50 M PEG 3350 100.0 uL 1 M MES pH=6.5 100.0 uL 1 M Natrijev citrat 250.00 uL 0.2 M prometazin  210.00 uL H <sub>2</sub> O	340 uL 50 M PEG 3350 100.0 uL 1 M MES pH=6.5 100.0 uL 1 M Natrijev citrat 250.00 uL 0.2 M labetalol  210.00 uL H <sub>2</sub> O	340 uL 50 M PEG 3350 100.0 uL 1 M MES pH=6.5 100.0 uL 1 M Natrijev citrat 250.00 uL 0.2 M Propranolol-HCl  210.00 uL H <sub>2</sub> O	340 uL 50 M PEG 3350 100.0 uL 1 M MES pH=6.5 100.0 uL 1 M Natrijev citrat 250.00 uL 0.2 M propranolol  210.00 uL H <sub>2</sub> O
340 uL 50 M PEG 3350 100.0 uL 1 M MES pH=6.5 100.0 uL 1 M natrijev citrat 250.00 uL 0.2 M D-dopa  210.00 uL H <sub>2</sub> O	340 uL 50 M PEG 3350 100.0 uL 1 M MES pH=6.5 100.0 uL 1 M natrijev citrat 250.00 uL 0.2 M L-dopa  210.00 uL H <sub>2</sub> O	340 uL 50 M PEG 3350 100.0 uL 1 M MES pH=6.5 100.0 uL 1 M natrijev citrat 250.00 uL 0.2 M prometazin  210.00 uL H <sub>2</sub> O	340 uL 50 M PEG 3350 100.0 uL 1 M MES pH=6.5 100.0 uL 1 M natrijev citrat 250.00 uL 0.2 M labetalol  210.00 uL H <sub>2</sub> O	340 uL 50 M PEG 3350 100.0 uL 1 M MES pH=6.5 100.0 uL 1 M natrijev citrat 250.00 uL 0.2 M propranolol-HCl  210.00 uL H <sub>2</sub> O	340 uL 50 M PEG 3350 100.0 uL 1 M MES pH=6.5 100.0 uL 1 M natrijev citrat 250.00 uL 0.2 M propranolol  210.00 uL H <sub>2</sub> O
340 uL 50 M PEG 3350 100.0 uL 1 M MES pH=6.5 100.0 uL 1 M natrijev citrat 250.00 uL 0.2 M D-dopa  210.00 uL H <sub>2</sub> O	340 uL 50 M PEG 3350 100.0 uL 1 M MES pH=6.5 100.0 uL 1 M natrijev citrat 250.00 uL 0.2 M L-dopa  210.00 uL H <sub>2</sub> O	340 uL 50 M PEG 3350 100.0 uL 1 M MES pH=6.5 100.0 uL 1 M Natrijev citrat 250.00 uL 0.2 M prometazin  210.00 uL H <sub>2</sub> O	340 uL 50 M PEG 3350 100.0 uL 1 M MES pH=6.5 100.0 uL 1 M natrijev citrat 250.00 uL 0.2 M labetalol  210.00 uL H <sub>2</sub> O	340 uL 50 M PEG 3350 100.0 uL 1 M MES pH=6.5 100.0 uL 1 M natrijev citrat 250.00 uL 0.2 M propranolol-HCl  210.00 uL H <sub>2</sub> O	340 uL 50 M PEG 3350 100.0 uL 1 M MES pH=6.5 100.0 uL 1 M Natrijev citrat 250.00 uL 0.2 M propranolol  210.00 uL H <sub>2</sub> O

## § 9. ŽIVOTOPIS

### Osobni podatci

Ime i prezime: Tea Domin

Datum rođenja: 12.07.1978.

Mjesto rođenja: Zagreb

### Obrazovanje

1984 - 1992      Osnovna škola Rude, Rude

1992 - 1996      XVI. Gimnazija, Zagreb

1996 - 2019      Prirodoslovno-matematički fakultet Sveučilišta u Zagrebu, kemijski  
odsjek, smjer: dipl. inženjer kemije

Aktivno se služim u govoru i pismu njemačkim, engleskim i francuskim jezikom te hrvatskim znakovnim jezikom.

Zaposlena sam u Hrvatskom savezu gluhih i nagluhih.